

Señor

SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Superintendencia de Industria y Comercio

Ministerio de Comercio, Industria y Turismo

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-070011- -00013-0000

Fecha: 2014-01-09 14:54:00 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 412 REPOSPRESRECU Folios: 22

Re.: Expediente **No. 10 070011**

Solicitud de Patente PCT Entrada en Fase Nacional para:

**“PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO”.**

Solicitante: **MONSANTO TECHNOLOGY LLC**

RECURSO DE REPOSICIÓN

Yo, **MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO**, mayor de edad, domiciliada e identificada como aparece al pie de mi firma, apoderada de la sociedad solicitante en el asunto de la referencia, atentamente acudo a su Despacho con el fin de interponer **RECURSO DE REPOSICIÓN** (art. 50 C.C.A.) para que se revoque en su totalidad la resolución No. **73076** de 29 de noviembre de 2013, notificada por listado desfijado el 3 de diciembre de 2013.

1. LA RESOLUCION No. 73076

La Superintendencia de Industria y Comercio expidió la Resolución No. 73076 por la cual se niega la solicitud de patente radicada el día 10 de junio de 2010, para el invento denominado: **“PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO”**, y radicada bajo el expediente N° **10 070011**.

2. FUNDAMENTO DE LA RESOLUCION No. 73076

La Resolución 73076 establece en su artículo sexto que la las reivindicaciones 1 a 24 no cumplen con el requisito de nivel inventivo.

Para soportar tal afirmación exponen los siguientes argumentos:

- El problema planteado consiste en suministrar plantas resistentes a infestaciones de insectos del orden *lepidóptera*.
 - Para resolver este problema, la solicitud proporciona un evento transgénico MON87701 de soja, y células, semillas y plantas que comprenden un ADN diagnóstico el evento de soja.
 - La invención también provee composiciones que comprenden secuencias de nucleótidos que son diagnósticos para dicho evento de soja en una muestra biológica, sondas y cebadores para su uso en la detección de secuencias de nucleótidos que son diagnósticos de la presencia de dicho evento en soja en una muestra biológica, y métodos para detectar la presencia de dichas secuencias de nucleótidos del evento de soja en una muestra biológica.
 - La invención provee además métodos de cultivo de las semillas de dicho evento de soja en plantas de soja, y métodos de desarrollo para producir plantas de soja que comprenden el ADN diagnóstico del evento de soja.
- a) Basándose en la información anterior, el examinador considera que la reivindicación 1, no cumple con el requisito de nivel inventivo teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:
- El documento D1 divulga el gen TIC107, que codifica la proteína cry1A que exhibe un alto grado de resistencia a lepidópteros. El documento además divulga los métodos para la detección de dicho gen introducido en la planta de soja, usando una PCR que hace necesario el diseño de cebadores y sondas específicos para el gen introducido en una posición específica del genoma de la soja.
 - La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 1 y el documento D1 consiste en que las secuencias específicas reclamadas por la solicitud corresponden a las secuencias flanco para el gen en el sitio de inserción de la solicitud, dichas secuencias no están divulgadas en el documento D1 puesto que el sitio de inserción en dicho documento es diferente.
 - El efecto que produce esta diferencia no resulta evidente puesto que ambos eventos de transformación involucran el inserto TIC107 y lo que cambia es el punto de inserción del mismo en el genoma de la planta de soja, y por lo tanto el segmento de DNA flanqueante de la planta, el solicitante no proporciona pruebas de que dicho cambio produzca un efecto técnico.

b) Así mismo, el examinador considera que la reivindicación 5 y la reivindicación 12 carecen de nivel inventivo a la luz de la anterioridad D1, teniendo en cuenta las siguientes consideraciones:

- La diferencia entre la invención, definida en la reivindicación 12 y el procedimiento del documento D1 consiste en que los cebadores utilizados no tienen las mismas secuencias, puesto que el gen TIC107 se encuentra en un sitio de inserción diferente en cada caso.
- El efecto que produce esta diferencia no resulta evidente puesto que ambos eventos de transformación involucran el inserto TIC107 y lo que cambia es el punto de inserción del mismo en el genoma de la planta de soja, y por lo tanto el segmento de ADN flanqueante de la planta, el solicitante no proporciona pruebas de que dicho cambio produzca un efecto técnico.
- El documento D1 revela el uso de las mismas técnicas moleculares para la detección de un evento de inserción de TIC107 en soja, y divulga el diseño y uso de cebadores específicos para el sitio de inserción usado por dicho documento. Debido a que el diseño de cebadores corresponde a un proceso rutinario para el experto en la materia, para lo cual existen múltiples herramientas en la red, tal como el solicitante también señala en su respuesta al oficio No. 4538, se considera que un método para la detección de un evento de inserción TIC107 en un sitio del genoma de la soja diferente al divulgado en D1 es una solución alternativa al problema técnico planteado y por lo tanto no presenta nivel inventivo.
- De la misma manera, la determinación de la cigosidad de una planta es un proceso rutinario, a partir de los resultados de la detección del evento, que un experto medio está en capacidad de realizar.

c) Finalmente, sobre los argumentos del solicitante en relación con las objeciones planteadas en las acciones oficiales, la Examinadora responde que *"... la descripción del presente documento no demuestra que el sitio de inserción del gen TIC107 en el evento MON87701 presente un efecto técnico inesperado frente a otras plantas de soja modificadas con el mismo gen, además el proceso de modificar una planta en un sitio de inserción diferente se encuentra bien documentado, así como el gen y su inserción en plantas de soja (documento D1)."*

3. FUNDAMENTOS DEL RECURSO

Presento a su Despacho las siguientes consideraciones que justifican la revocatoria de la Resolución N° 73076 del 29 de noviembre de 2013:

3.1 Violación del artículo 18 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina

Según el artículo 14 de la Decisión 486:

*“Los Países Miembros otorgarán patentes para las invenciones, sean de producto o de procedimiento, en todos los campos de la tecnología, **siempre que sean nuevas, tengan nivel inventivo y sean susceptibles de aplicación industrial.**”*

Según el artículo 18 de la Decisión 486:

“Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica. ”

En primer lugar, en soporte de la actividad inventiva del presente evento, se adjunta una declaración jurada (y su traducción al español) de John Miklos, uno de los inventores de la presente solicitud.

En particular, la declaración jurada detalla la producción y selección del evento MON87701. Como se describe en el documento, el presente evento muestra propiedades superiores sobre otros eventos de soja resistentes a insectos, incluyendo otros eventos que comprenden TIC107 (Cry1Ac). Se destaca que el presente evento proporciona un alto nivel de resistencia a insectos comparado con los eventos que comprenden otras construcciones, y que el presente evento no muestra la disminución de tolerancia a glifosato que se observa en otros eventos que contienen TIC107 cuando se lo combina con un evento de tolerancia a glifosato, tal como el divulgado en el D1.

Especialmente, el segundo párrafo titulado “Producción y selección del evento MON87701” en la declaración jurada describe la producción y el análisis de los eventos que contienen Cry, divulgados en el D1. Como se describió, estos eventos difieren del presente evento tanto molecularmente como en su desempeño. Por ejemplo, los eventos divulgados en el D1 no sólo difieren en la ubicación del inserto, que afecta las secuencias de unión, sino que también están

unidos a marcadores de selección (nptII o CP4), mientras que el presente evento no está unido a un marcador de selección. Además, como se describe en la declaración jurada, el evento 781 del D1 resultó en niveles no comerciales de tolerancia a glifosato cuando se cruzó con una planta comercialmente útil tolerante a herbicida. El presente evento, sin embargo, no muestra esta pérdida en la resistencia a glifosato.

Este fue el primer producto protegido contra insectos en soja en una industria con muchos elementos desconocidos. Por otro lado, el evento de control de insectos se combinaría mediante cría con un evento Roundup Ready para un control de malezas sobre la planta además de la protección contra insectos. En el transcurso del proceso de desarrollo, se evaluaron por lo menos seis genes insecticidas en plantas, diversas configuraciones de construcciones, diversos elementos de expresión diferentes, miles de plantas de soja y cientos de eventos para hallar el mejor evento comercialmente viable, MON87701.

Se condujo una amplia evaluación de proteínas de toxinas insecticidas potenciales en el laboratorio contra plagas blanco para evaluar su eficacia en el control de alimentación por larvas. Se emplearon seis toxinas Cry para su evaluación en plantas con diversas combinaciones de dos péptidos de tránsito a cloroplastos (CTP) diferentes, cuatro promotores diferentes para dirigir la expresión y tres elementos terminadores 3' diferentes. También se emplearon varios mecanismos de distribución de los transgenes en soja mediante el uso de dos marcadores de selección diferentes (CP4 y nptII) y un método de 2T-ADN (que permite obtener eventos sin marcadores). Los eventos descritos previamente 781 (ligado molecularmente a CP4), 862 y 726 (ligado molecularmente a nptII) eran eventos de prueba de concepto que demostraron una buena eficacia contra la plaga blanco, si bien no cumplían con los criterios comerciales más importantes.

Los eventos ligados nptII no se emplearon comercialmente debido a la percepción desfavorable del público de una soja transgénica con marcadores de antibióticos, tal como nptII. La línea 781 contenía un gen CP4 que confiere tolerancia a glifosato, pero no obstante el casete de expresión CP4 fue diseñado para conferir tolerancia durante la transformación y no confería una tolerancia reproductora adecuada para fines comerciales. Se evaluó el apilamiento de caracteres con el evento de soja Roundup Ready (40-3-2) y el evento 781, pero una interacción de caracteres perjudicial condujo a niveles no comerciales de tolerancia de roundup en múltiples germoplasmas de soja. [Una de ellas (línea 781) contenía un único transgen simple y sólo se llevó hasta la integración temprana de caracteres; sin embargo, eventualmente se descartó debido a una interacción putativa entre su marcador de selección *cp4* y el evento comercial *cp4* (40-3-2) que redujo la tolerancia a glifosato en soja Roundup Ready®]

Por ese motivo se inició un sistema de distribución de transgenes 2T-ADN para evaluar la mejor combinación de genes y casetes de expresión insecticidas para dicho gen. En ese momento no se comprendió cuál sería el casete de expresión que funcionaría bien al desprenderse de un marcador de selección. En este momento, se pensaba que la unión del transgen de interés a un marcador de selección facilitaría la selección del transgen insertado en loci de transcripción activa y esto conduciría potencialmente a una buena expresión del gen de interés, es decir, del gen insecticida. No estábamos seguros de si los casetes de expresión de utilidad demostrada previamente serían tan efectivos en un sistema de distribución 2T-ADN, en el cual la meta era identificar los eventos GOI que se separaban del marcador de selección lo cual permitía que el inserto del marcador de selección segregara desprendiéndose así del inserto del gen insecticida. La otra incertidumbre era si el promotor que dirigía la expresión del marcador de selección estaba mejorando la expresión del gen insecticida de interés y si la con separación de los dos casetes de expresión se perdería eficacia.

El examen y selección de eventos comprendía la generación de varios miles de explantes para cada una de diez construcciones individuales. Se generaron brotes, cada uno de los cuales representa un evento de transformación individual, a partir de los explantes. La eficacia de transformación, es decir, el número de brotes producidos por número total de explantes producidos, variaba en un rango de un 0,2-0,8% aproximadamente. Se evaluaron aproximadamente seiscientos cuarenta y cuatro eventos transgénicos R0 diferentes por la presencia del gen de interés y la expresión de dicho gen.

Se eliminó la construcción Cry1Ca debido a los efectos citotóxicos observados del transgen expresado. Esta construcción demostró tener la menor eficiencia TE, de un 0.2%, y solamente dio como resultado seis eventos R0 con brotes que no presentaron niveles detectables de la proteína Cry1Ca según un ELISA.

Se usaron tres promotores diferentes para expresar el gen Cry1Bb en soja (eFMV, Arab-SSU1A y Arab-Act2). Se evaluaron aproximadamente 111 eventos por la expresión de la proteína Cry1Bb en R0, observándose un mejor desempeño de Arab-SSU1A y Arab-Act2. La evaluación de la expresión de R1 de estos eventos demostró una expresión pobre de todos los eventos excepto los tres eventos del casete de expresión Arab-SSU1A. Unos cuantos de estos eventos fueron llevados al campo para realizar pruebas de infestación artificial, pero ninguno pasó la prueba.

Además, aunque el Examinador afirma que modificar una planta de soja con el mismo gen en una diferente ubicación es algo bien conocido en el arte, el Solicitante señala que el

Examinador no ha tenido en cuenta el proceso ni la incertidumbre o la imposibilidad de predecir el nuevo punto de inserción que permite obtener el efecto deseado. El que la anterioridad D1 enseñe un gen TIC107 que logra un efecto conocido no significa que dicho gen pueda insertarse en cualquier punto y se logre el mismo efecto. De hecho, el experto con habilidad en la materia sabe que las secuencias flanqueantes son tan importantes como el gen mismo, ya que son dichas secuencias las que orientan a la enzimas correspondientes para que den inicio al proceso de replicación y generación del los aminoácidos correspondientes. No existe garantía alguna que un gen mantenga su actividad al momento de modificar las secuencias flanqueantes y el experto con habilidad en la materia no puede predecir de ninguna manera el efecto que tiene modificar dichas secuencias flanqueantes.

En particular, como se describe arriba y en la declaración adjunta, la selección de un evento específico con características deseables, como el presente evento, involucra generar varios miles de explantos de cada constructo probado, seguido por varias rondas de selección que incluyen ensayos en campo. Por lo tanto, aunque los métodos generales de transformación de soja pueden haber sido divulgados en el arte, la producción, detección y selección del presente evento no serían obvias de ninguna manera.

De las cepas encontradas y descritas arriba, se hicieron las siguientes pruebas de campo para determinar su efectividad:

Cry2Ab: se evaluó con un promotor (Arab-Act2); Arab-Act2 proporcionó el mejor nivel de expresión; 44 eventos; 25 GOI positivos; 12 eventos libres de marcadores; 2 moleculares limpios; **Niveles de expresión pobres y falló la eficacia.**

En particular, se observó daño por *A. gemmatilis* en las dos líneas que expresan Cry2Ab2, con un promedio de entre un 7,5% y 56,7% de defoliación como máximo en las líneas 22435-111 y 22175-60, respectivamente. Nuevamente, si bien estos niveles de daños eran significativamente menores que los observados en sus respectivas líneas isogénicas, se acercaron (en la primera) o excedían ampliamente (en la segunda) el nivel de lesiones económicamente aceptable.

Cry1Ac (TIC107): se evaluó un promotor (Arab-SSU1A); Arab-SSU1A proporcionó el mejor nivel de expresión; 110 eventos; 42 GOI positivos; 12 eventos libres de marcadores; 4 moleculares limpios; **se seleccionó un evento comercial**

Se logró una presión alta con *A. gemmatilis* en ambas ubicaciones. Un análisis con un ANOVA de cuatro vías de efectos principales determinó que la ubicación, la línea y las réplicas eran

todas fuentes significativas de variabilidad en los datos de daños larvales. En una ubicación a campo, el daño larval en las comprobaciones negativas promedió un 62,5-79,5% desfoliación como máximo. Por otro lado, no se observaron daños en los lotes de ninguna de las tres líneas que expresan TIC107.

También se logró una gran presión con *P. includens* en ambas ubicaciones, y los resultados son ampliamente semejantes a los obtenidos con *A. gemmatalis*. Un análisis de ANOVA de cuatro vías de efectos principales permitió determinar que la ubicación y la línea constituían fuentes significativas de variabilidad en los datos de daños larvales, pero a diferencia de *A. gemmatalis* no fue así para las réplicas. En una ubicación a campo, el daño larval máximo en las comprobaciones negativas promedió un 71,3-80,0%. Por otro lado, no se observaron daños en los lotes de ninguna de las tres líneas que expresan TIC107.

Por otro lado, aún si uno fuera a generar eventos TIC107 nuevos y probara las características agronómicas deseadas, sería imposible producir y seleccionar el mismo evento, que comprenda las secuencias de unión de las SEQ ID NO: 1-4 y la secuencia del transgen más la secuencia genómica de la SEQ ID NO: 6. Por ejemplo, la soja tiene un genoma haploide de un tamaño aproximado de 1100 Mb (1100 millones de bases). Aún asumiendo que sólo el 10% del genoma es adecuado para la integración del transgen, lo cual es una estimación conservadora, habría aún sólo una probabilidad de 1 en 110 millones de obtener el evento reivindicado y las secuencias asociadas al mismo.

Además, contrariamente a la afirmación del Examinador, la localización de un inserto transgénico en el genoma de una planta afecta la actividad del transgen insertado. En particular, como se describe en las líneas 7-24 de la página 2 de la solicitud PCT publicada, la expresión de genes foráneos en plantas está influenciada por la posición cromosomal o la proximidad de elementos de regulación transcripcional cercanos al sitio de inserción. Puede haber también diferencias en los patrones de expresión espacio-temporales, por ejemplo, diferencias en la expresión relativa de un transgen en varios tejidos de la planta, que pueden no corresponder a los patrones esperados de los elementos de regulación transcripcional presentes en la construcción génica introducida.

Por lo tanto, dado el efecto de la posición en la actividad del transgen y en los resultados superiores e inesperados demostrados por las plantas que comprenden el evento, como se discute en la declaración jurada anexa, no habría ninguna expectativa de éxito en llegar al evento aquí reivindicado, el cual proporciona los niveles de resistencia a insectos deseados y la falta de cualquier deficiencia agronómica indeseable, tal como una reducida tolerancia a

glifosato cuando se lo combina con un evento tolerante a glifosato, la cual está ausente en la divulgación de la presente memoria descriptiva y en el razonamiento en retrospectiva.

Con respecto a la afirmación del Examinador de que los cebadores aquí reivindicados y los métodos de detección carecen de actividad inventiva respecto del D1, debido a que el uso de cebadores para identificar un sitio de inserción ya ha sido divulgado, el solicitante señala que el D1 no divulga el presente evento y, como se describe anteriormente, no habría ninguna expectativa de éxito en llegar al presente evento con el transgen TIC107 insertado en la ubicación específica en el genoma de soja. Sin el conocimiento de la ubicación específica del inserto, no habría ninguna forma de que una persona versada en la materia diseñara cebadores o detectara el evento.

En virtud de los argumentos antes mencionados y de la declaración adjunta, el presente evento, y por lo tanto las secuencias, cebadores, métodos de detección, conjuntos de elementos y métodos para determinar zigocidad aquí reivindicados no serían obvios respecto de la referencia citada.

Por último, el solicitante quisiera observar que en ausencia de un segundo documento que demuestre la efectividad del gen TIC107 insertado en un segundo lugar diferente al de la anterioridad D1, el examinador no tiene ningún tipo de sustento técnico válido para sus objeciones. No existe ningún soporte en la anterioridad D1 que enseñe o sugiera que la inserción del gen TIC107 en cualquier otro punto diferente al allí divulgado tendría el efecto reclamado en la presente solicitud y descrito en la declaración jurada adjunta.

En ausencia de documentos adicionales que sustenten los argumentos del examinador, la única evidencia que tiene el examinador de que ubicar el gen TIC107 en otra posición dentro del genoma de la soja es la solicitud en estudio. Por lo tanto, los argumentos del examinador solo tienen sustento técnico si se fundamentan en un estudio retrospectivo de la solicitud en estudio. El estudio retrospectivo de las solicitudes no es una forma aceptable para evaluar la altura inventiva de las mismas y en ausencia de evidencia documental que sustente debidamente los argumentos del examinador, la resolución en cuestión no se encuentra debidamente motivada ya que el examinador no está proporcionando ningún argumento técnico válido que sustente la falta de altura inventiva de la presente solicitud basado en el hecho que la inserción del gen TIC107 en un punto diferente al divulgado en D1 de origen a una planta funcional con el mismo efecto técnico del estado del arte.

Independiente de cuan conocida es la técnica de implantación de genes, identificación de secuencias o uso de cebadores el experto con habilidad en la materia no tiene forma de saber si ubicar una secuencia genética conocida en otra parte del genoma de una planta, con cebadores e identificadores diferentes, también da origen a una planta con la misma funcionalidad. De hecho, el experto con habilidad ordinaria en la materia reconocerá que los argumentos del examinador son errados ya que parte de la premisa de que los genes flanqueantes no tienen ningún efecto sobre la actividad de la secuencia genética que flanquean.

3.2 Conclusión

Por lo tanto, queda así demostrado en forma definitiva, que la Resolución acá impugnada fue expedida con violación de los artículos 14 y 18 de la Decisión 486 y que en consecuencia, la misma debe ser revocada y en su lugar se debe otorgar la solicitud de patente para la invención **“PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO”** a favor del **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC.**, por cumplir con los requisitos de patentabilidad.

4. FUNDAMENTOS DE DERECHO

Fundamento el presente recurso en las siguientes normas:

- Artículo 14 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.
- Artículo 16 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina.

5. PETICIÓN

Solicito a su despacho que con fundamento en los hechos y normas citadas:

1. Se revoque la resolución No. **73076** del 29 de noviembre de 2013 en cuanto a la negación del privilegio de patente de invención.
2. Que como consecuencia de la revocatoria, se otorgue el privilegio de patente a la invención titulada **“PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO”**.

6. **PRUEBAS**

Solicito que se tengan como tales, los documentos contenidos en el Expediente No. **10 070011** de la referencia, en el que se presentó la solicitud de privilegio de patente para la invención titulada "**PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCION DEL MISMO**" a favor de **MONSANTO TECHNOLOGY, LLC.**

7. **NOMBRE Y DIRECCION DEL RECURRENTE**

MONSANTO TECHNOLOGY, LLC.

800 North Lindberg Boulevard,

San Luis, Missouri 63167

ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

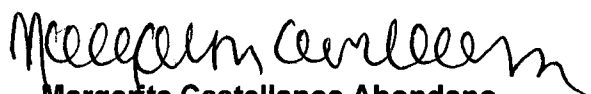
8. **ANEXOS**

- Declaración juramentada del inventor John Miklos;
- Traducción de la declaración juramentada del inventor John Miklos.

9. **NOTIFICACIONES**

Las recibiré en la Secretaría de su Despacho y en mi oficina en la **Calle 94 A No. 7 A-09**, teléfono 7560770.

Del Señor Superintendente,


Margarita Castellanos Abondano
C.C. No. **39.779.654** de Bogotá
T.P.A. No. **70.819** del C.S.J.
Calle 94 A No. 7 A-09 – Bogotá, D.C.
Teléfono: 756 0770

Bogotá, D.C. - **9 ENE. 2014**
MCA/

In regard to Peruvian Patent Application Number 1914-2008

in the name of MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

For: Soybean Plant and Seed Corresponding to Transgenic MON87701 Event
and Methods for Detection Thereof

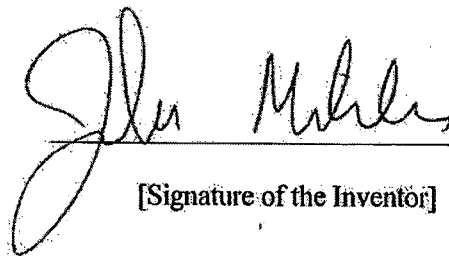
DECLARATION OF JOHN MIKLOS

By this declaration, I, John Miklos, hereby attest to the following:

1. That I am an inventor of the above-captioned patent application, the ownership of which is assigned to Monsanto Technology, LLC.
2. That I worked to create transgenic MON87701 Event.
3. That I have reviewed and am familiar with the document titled "MON87701 Event Production and Selection", filed concurrently with this Declaration. It is my recollection and understanding that this document accurately reflects the creation and selection of the MON87701 Event.

In witness thereof, I sign this affidavit in Creve Coeur, Missouri USA, this 18th day of October, 2013.

Date: 11/18/13


[Signature of the Inventor]

NOTARIAL CERTIFICATE

UNITED STATES OF AMERICA)

STATE OF MISSOURI) SS.

COUNTY OF ST. LOUIS)

In St. Louis County, Missouri, United States of America, on October 18th, 2013, before me Notary Public personally appeared John Miklos, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person who subscribed to the within instrument and its Schedule A titled "MON87701 Event Production and Selection" hereto, and acknowledged to me that he executed the same in his authorized capacity of inventor of the MON87701 Event proprietary of Monsanto Technology LLC, and that by his signature on the instrument John Miklos, employee of Monsanto Company, executed the instrument.



Notary Public

Notarial Seal)



MICHELLE LUDWIG
My Commission Expires
July 13, 2017
St. Louis County
Commission #13550747

MON87701 Event Production and Selection

There were many unknown problems to be solved at the time we began efforts to produce a transgenic soybean plant expressing a Bt toxin for protecting soybean plants against insect infestation. Ultimately, the transgenic soybean plant containing a Bt gene would be combined by breeding with a transgenic event resistant to the herbicide glyphosate to enable farmers to spray herbicide over the top of this breeding stack to achieve weed control in addition to insect protection. During the development process we evaluated at least six different insecticidal genes in soybean plants, evaluated several construct configurations, several different expression elements, thousands of transgenic soybean plants, and hundreds of transgenic events before identifying the MON87701 Event as the best commercially viable event.

An extensive evaluation of potential insecticidal toxin proteins was tested in the lab against target pests of soybean to evaluate their effectiveness at controlling larval feeding. Six different Cry toxins were advanced for testing in plants with various combinations of two different chloroplast transit peptides (CTP), four different promoters driving expression, and three different 3' terminator elements. The delivery mechanism for the transgenes into soy was also varied by utilizing two different selectable markers (CP4 and nptII) and a 2T-DNA method that provided a means for obtaining marker free events. Events 781 (molecularly linked to CP4), 862 and 726 (molecularly linked to nptII) were products of early testing and were produced to demonstrate that transgenic soybean plants could be developed with Bt toxins that exhibited efficacy to the target pests, however these events didn't not exhibit key commercial criteria. First, the events linked to nptII were not pursued commercially due to unfavorable public perception of transgenic soybean containing antibiotic markers such as nptII. Second, even though the 781 event contained a CP4 gene conferring tolerance to glyphosate, the linked CP4 expression cassette was designed to confer tolerance only during transformation and through the event selection process, and did not confer adequate reproductive tolerance for commercial purposes. Therefore, this 781 event was stacked by breeding with a transgenic soybean event (event 40-3-2) which has proven commercial levels of glyphosate tolerance. Unexpectedly, the breeding stack of these two events, through some unknown deleterious trait interaction, resulted in non-commercial levels of tolerance to glyphosate when tested in multiple different soybean germplasms. Thus the commercial development of the 781 event was terminated because of the deleterious effects when bred together with a commercially useful herbicide tolerant soybean event 40-3-2. Therefore, it was not understood at the time whether any expression cassette expressing a Bt gene would function well in soybean when bred together with the 40-3-2 event.

At the time the 781 Event was produced, it was believed that linking the transgene to a selectable marker would facilitate selection of the transgene inserted into transcriptionally active loci, potentially leading to good expression of the gene of interest, i.e. the insecticidal Bt gene. It was uncertain whether previously proven expression cassettes would be as effective in a 2T-DNA delivery system in which the goal was to identify events containing the gene of interest unlinked to any selectable marker, allowing for the selectable marker insert to be

segregated away from the insecticidal gene insert. It was also unknown whether the promoter driving expression of the selectable marker, when linked to the cassette expressing the toxin gene, was enhancing the expression of the insecticidal gene. By unlinking those two expression cassettes, it was unclear if the toxin expression was to be reduced and the resulting event containing only the toxin gene would exhibit decreased efficacy.

In order to identify the MON87701 Event, ten different constructs each containing different arrangements and combinations of transcriptional and translational regulatory elements and several different sequences encoding different Bt toxins were produced and used to generate transgenic explants. Several thousand explants were generated for each of these ten individual constructs. Thousands of shoots were produced from these tens of thousands of explants, each shoot representing an individual transformation event. Transformation efficiency, i.e. the number of shoots produced per total number of explants produced, ranged from approximately 0.2-0.8%. Approximately, six hundred and forty four (644) different R0 transgenic events were evaluated for the presence of the gene of interest and evaluated to determine the level of expression of that gene.

Events containing a Cry1Ca toxin were eliminated due to perceived cytotoxic effects of the expressed transgene. This construct demonstrated the lowest TE efficiency of 0.2% and resulted in only six shoots R0 events that had no detectable levels of the Cry1Ca protein by ELISA.

Three different promoters were used to express a Cry1Bb gene in soybean (eFMV, Arab-SSU1A, and Arab-Act2). Approximately 111 events were evaluated for expression of the Cry1Bb protein at R0 with Arab-SSU1A and Arab-Act2 performing the best. R1 expression evaluation of these events resulted in poor expression of all events except three events from the Arab-SSU1A expression cassette. A couple events were taken to the field for artificial infestation testing, but none passed these trials.

Field testing:

Events expressing a Cry2Ab toxin were tested and one promoter (Arab-Act2)- Arab-Act2 produced excellent expression levels; 44 events; 25 GOI positive; 12 marker-free events; 2 with clean molecular; Poor expression levels and failed efficacy.

In particular, *A. gemmatilis* damage was observed in the two Cry2Ab2-expressing lines, averaging 7.5% and 56.7% defoliation at maximum in lines 22435-111 and 22175-60, respectively. Again, while these damage levels were significantly lower than those exhibited by their respective isogenic lines, they approached (former) or greatly exceeded (latter) the economic injury level.

Events containing Cry1Ac (TIC107) were tested and one promoter (Arab-SSU1A)- Arab-SSU1A gave us the best expression level; 110 events ;42 GOI positive ;12 marker-free events; 4 with clean molecular; one commercial event chosen

High pressure was achieved with *A. gemmatalis* at both locations. A four-way main effects ANOVA determined that location, line, and replicate were all significant sources of variability in larval damage data. At one field location, larval damage in the negative checks averaged 62.5–79.5% defoliation at maximum. In contrast, no damage was observed in plots of any of the three TIC107-expressing lines.

High pressure was also achieved with *P. includens* at both locations, and results largely mirror those obtained with *A. gemmatalis*. A four-way main effect ANOVA determined that location and line were significant sources of variability in larval damage data, but in contrast to *A. gemmatalis* replicate was not. At one field location, maximum larval damage in the negative checks averaged 71.3–80.0%. In contrast, no damage was observed in plots of any of the three TIC107-expressing lines.

En relación con la solicitud de patente peruana Nro. 1914-2008

Presentada a nombre de MONSANTO TECHNOLOGY, LLC

**Título: PLANTAS Y SEMILLAS DE SOJA CORRESPONDIENTES AL EVENTO
TRANSGÉNICO MON87701 Y METODOS DE DETECCIÓN DEL MISMO**

DECLARACION DE JOHN MIKLOS

Mediante la presente declaración, yo, John Miklos, certifico lo siguiente:

1. Que soy inventor de la solicitud de patente antes mencionad, titularidad que transfería a Monsanto Technology, LLC.
2. Que trabajé en la creación del evento transgénico MON87701.
3. Que revisé y estoy familiarizado con el documento denominado "Producción y Selección del evento MON87701", que se presenta conjuntamente con esta Declaración. Según mi recuerdo y entendimiento el presente documento refleja de forma exacta la creación y selección del evento MON87701.

En fe de lo cual, firmo esta declaración en _____, Missouri EE. UU de
Norteamérica, a los _____ días del mes de _____ del año dos mil trece.

Fecha: _____

Firma del inventor: _____

CERTIFICACIÓN NOTARIA

ESTADOS UNIDOS DE NORTEAMÉRICA)

ESTADO DE MISSOURIO

CONDADO DE ST. LOUIS

A saber

En _____ Missouri, Estados Unidos de Norteamérica, a los _ de octubre de 2013
ante mí, notario público, compareció personalmente John Miklos quien me demostró mediante
evidencia satisfactoria ser la persona que suscribe el documento adjunto y el Anexo A titulado
“Producción y Selección del Evento MON87701” adjunto y quien reconoció que otorgó el
documento en su carácter de inventor del evento MON87701 propiedad de Monsanto
Technology LLC, y que mediante su firma en el documento, John Miklos, empleado de
Monsanto Company otorgó ese instrumento.

Notario público

Sello notarial

Producción y selección del evento MON87701

Este fue el primer producto protegido contra insectos en soja en una industria con muchos elementos desconocidos. Finalmente, el evento de control de insectos se combinaría mediante cría con un evento Roundup Ready para un control de malezas sobre la planta además de la protección contra insectos. En el transcurso del proceso de desarrollo, se evaluaron por lo menos seis genes insecticidas en plantas, diversas configuraciones de construcciones, diversos elementos de expresión diferentes, miles de plantas de soja y cientos de eventos para hallar el mejor evento comercialmente viable, MON87701.

Se condujo una amplia evaluación de proteínas de toxinas insecticidas potenciales en el laboratorio contra plagas blanco para evaluar su eficacia en el control de alimentación por larvas. Se emplearon seis toxinas Cry para su evaluación en plantas con diversas combinaciones de dos péptidos de tránsito a cloroplastos (CTP) diferentes, cuatro promotores diferentes para dirigir la expresión y tres elementos terminadores 3' diferentes. También se emplearon varios mecanismos de distribución de los transgenes en soja mediante el uso de dos marcadores de selección diferentes (CP4 y nptII) y un método de 2T-ADN (que permite obtener eventos sin marcadores). Los eventos descritos previamente 781 (ligado molecularmente a CP4), 862 y 726 (ligado molecularmente a nptII) eran eventos de prueba de concepto que demostraron una buena eficacia contra la plaga blanco, si bien no cumplían con los criterios comerciales más importantes. Los eventos ligados nptII no se emplearon comercialmente debido a la percepción desfavorable del público de una soja transgénica con marcadores de antibióticos, tal como nptII. La línea 781 contenía un gen CP4 que confiere tolerancia a glifosato, pero no obstante el casete de expresión CP4 fue diseñado para conferir tolerancia durante la transformación y no confería una tolerancia reproductora adecuada para fines comerciales. Se evaluó el apilamiento de caracteres con el evento de soja

Roundup Ready (40-3-2) y el evento 781, pero una interacción de caracteres perjudicial condujo a niveles no comerciales de tolerancia de roundup en múltiples germoplasmas de soja. [Una de ellas (línea 781) contenía un único transgen simple y sólo se llevó hasta la integración temprana de caracteres; sin embargo, eventualmente se descartó debido a una interacción putativa entre su marcador de selección *cp4* y el evento comercial *cp4* (40-3-2) que redujo la tolerancia a glifosato en soja Roundup Ready®]

Por ese motivo se inició un sistema de distribución de transgenes 2T-ADN para evaluar la mejor combinación de genes y casetes de expresión insecticidas para dicho gen. En ese momento no se comprendió cuál sería el casete de expresión que funcionaría bien al desprenderse de un marcador de selección. En este momento, se pensaba que la unión del transgen de interés a un marcador de selección facilitaría la selección del transgen insertado en loci de transcripción activa y esto conduciría potencialmente a una buena expresión del gen de interés, es decir, del gen insecticida. No estábamos seguros de si los casetes de expresión de utilidad demostrada previamente serían tan efectivos en un sistema de distribución 2T-ADN, en el cual la meta era identificar los eventos GOI que se separaban del marcador de selección lo cual permitía que el inserto del marcador de selección segregara desprendiéndose así del inserto del gen insecticida. La otra incertidumbre era si el promotor que dirigía la expresión del marcador de selección estaba mejorando la expresión del gen insecticida de interés y si la con separación de los dos casetes de expresión se perdería eficacia.

El examen y selección de eventos comprendía la generación de varios miles de explantes para cada una de diez construcciones individuales. Se generaron brotes, cada uno de los cuales representa un evento de transformación individual, a partir de los explantes. La eficacia de transformación, es decir, el número de brotes producidos por número total de explantes producidos, variaba en un rango de un

0,2-0,8% aproximadamente. Se evaluaron aproximadamente seiscientos cuarenta cuatro eventos transgénicos R0 diferentes por la presencia del gen de interés y la expresión de dicho gen.

Se eliminó la construcción Cry1Ca debido a los efectos citotóxicos observados del transgen expresado. Esta construcción demostró tener la menor eficiencia TE, de un 0.2%, y solamente dio como resultado seis eventos R0 con brotes que no presentaron niveles detectables de la proteína Cry1Ca según un ELISA.

Se usaron tres promotores diferentes para expresar el gen Cry1Bb en soja (eFMV, Arab-SSU1A y Arab-Act2). Se evaluaron aproximadamente 111 eventos por la expresión de la proteína Cry1Bb en R0, observándose un mejor desempeño de Arab-SSU1A y Arab-Act2. La evaluación de la expresión de R1 de estos eventos demostró una expresión pobre de todos los eventos excepto los tres eventos del casete de expresión Arab-SSU1A. Unos cuantos de estos eventos fueron llevados al campo para realizar pruebas de infestación artificial, pero ninguno pasó la prueba.

Pruebas a campo:

Cry2Ab: se evaluó con un promotor (Arab-Act2); Arab-Act2 proporcionó el mejor nivel de expresión; 44 eventos; 25 GOI positivos; 12 eventos libres de marcadores; 2 moleculares limpios; **Niveles de expresión pobres y falló la eficacia.**

En particular, se observó daño por *A. gemmatilis* en las dos líneas que expresan Cry2Ab2, con un promedio de entre un 7,5% y 56,7% de defoliación como máximo en las líneas 22435-111 y 22175-60, respectivamente. Nuevamente, si bien estos niveles de daños eran significativamente menores que los observados

en sus respectivas líneas isogénicas, se acercaron (en la primera) o excedían ampliamente (en la segunda) el nivel de lesiones económicamente aceptable.

Cry1Ac (TIC107): se evaluó un promotor (Arab-SSU1A); Arab-SSU1A proporcionó el mejor nivel de expresión; 110 eventos; 42 GOI positivos; 12 eventos libres de marcadores; 4 moleculares limpios; **se seleccionó un evento comercial**

Se logró una presión alta con *A. gemmatilis* en ambas ubicaciones. Un análisis con un ANOVA de cuatro vías de efectos principales determinó que la ubicación, la línea y las réplicas eran todas fuentes significativas de variabilidad en los datos de daños larvales. En una ubicación a campo, el daño larval en las comprobaciones negativas promedió un 62,5-79,5% defoliación como máximo. Por otro lado, no se observaron daños en los lotes de ninguna de las tres líneas que expresan TIC107.

También se logró una gran presión con *P. includens* en ambas ubicaciones, y los resultados son ampliamente semejantes a los obtenidos con *A. gemmatilis*. Un análisis de ANOVA de cuatro vías de efectos principales permitió determinar que la ubicación y la línea constituían fuentes significativas de variabilidad en los datos de daños larvales, pero a diferencia de *A. gemmatilis* no fue así para las réplicas. En una ubicación a campo, el daño larval máximo en las comprobaciones negativas promedió un 71,3-80,0%. Por otro lado, no se observaron daños en los lotes de ninguna de las tres líneas que expresan TIC107.